

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003500

International filing date: 02 March 2005 (02.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-059065
Filing date: 03 March 2004 (03.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

04. 3. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 5 9 0 6 5

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

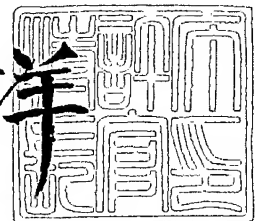
J P 2 0 0 4 - 0 5 9 0 6 5

出 願 人
Applicant(s): 大 門 雅 夫
第一化学薬品株式会社

2 0 0 5 年 4 月 1 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 P01031503
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県四街道市千代田五丁目 9 番 1 2 号
 【氏名】 大門 雅夫
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目 8 番 1 号 5 0 3 号室
 【氏名】 南野 徹
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都西東京市中町五丁目 1 7 番 2 号
 【氏名】 橋本 謙二
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都杉並区荻窪二丁目 3 8 番 1 3 号
 【氏名】 小室 一成
【特許出願人】
 【住所又は居所】 千葉県四街道市千代田五丁目 9 番 1 2 号
 【氏名又は名称】 大門 雅夫
【特許出願人】
 【識別番号】 390037327
 【氏名又は名称】 第一化学薬品株式会社
【代理人】
 【識別番号】 110000084
 【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所
 【代表者】 中嶋 俊夫
【選任した代理人】
 【識別番号】 100068700
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 有賀 三幸
【選任した代理人】
 【識別番号】 100077562
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 高野 登志雄
【選任した代理人】
 【識別番号】 100096736
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 中嶋 俊夫
【選任した代理人】
 【識別番号】 100089048
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 浅野 康隆
【選任した代理人】
 【識別番号】 100101317
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 的場 ひろみ
【選任した代理人】
 【識別番号】 100117156
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 村田 正樹



【選任した代理人】
【識別番号】 100111028
【弁理士】
【氏名又は名称】 山本 博人
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 164232
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

抗脳由来神経栄養因子抗体を含有する虚血性心疾患危険群診断薬。

【請求項 2】

血液中の脳由来神経栄養因子の濃度を測定するためのものである請求項 1 に記載の虚血性心疾患危険群診断薬。

【請求項 3】

抗脳由来神経栄養因子抗体および標識化抗脳由来神経栄養因子抗体を含む請求項 1 または 2 に記載の虚血性心疾患危険群診断薬。

【請求項 4】

抗脳由来神経栄養因子抗体および標識化剤を含有する虚血性心疾患危険群の診断キット。

【請求項 5】

血液中の脳由来神経栄養因子の濃度を測定するためのものである請求項 4 に記載の虚血性心疾患危険群の診断用キット。

【請求項 6】

抗脳由来神経栄養因子抗体および標識化抗脳由来神経栄養因子抗体を含む請求項 4 または 5 に記載の虚血性心疾患危険群の診断キット。

【請求項 7】

血液中の脳由来神経栄養因子の濃度を測定することを特徴とする虚血性心疾患危険群の検定方法。

【請求項 8】

抗脳由来神経栄養因子抗体を用いて脳由来神経栄養因子の濃度を測定するものである請求項 7 に記載の虚血性心疾患危険群の検定方法。

【請求項 9】

抗脳由来神経栄養因子抗体および標識化抗脳由来神経栄養因子抗体を用いて脳由来神経栄養因子の濃度を測定するものである請求項 7 に記載の虚血性心疾患危険群の検定方法。

【請求項 10】

血液中の脳由来神経栄養因子の濃度を測定することを特徴とする虚血性心疾患の治療薬の検定方法。

【請求項 11】

脳由来神経栄養因子を増加させる化合物を含有する虚血性心疾患の治療薬。

【請求項 12】

脳由来神経栄養因子を含有する虚血性心疾患の治療薬。

【書類名】明細書

【発明の名称】虚血性心疾患危険群診断薬

【技術分野】

【0001】

本発明は、虚血性心疾患危険群診断薬、診断法、予後予測法、および治療薬に関する。

【背景技術】

【0002】

冠動脈硬化を原因とする虚血性心疾患は、日本における全疾患死亡率の約7～8%を占め、現在なお全国で100万人以上が罹患している疾患である。食事の西欧化に伴い患者数は年々増加傾向にあり、医療経済の面からも、日本において虚血性心疾患の予防、管理が重要であることは明かである。冠動脈硬化の危険因子としては糖尿病、喫煙、高血圧、高脂血症、家族歴、加齢、肥満などが知られている他、最近ではインスリン抵抗性、肥満、高血圧、耐糖能異常などを主訴とする代謝性症候群 (metabolic syndrome) などが知られている。これらを原因として心臓を栄養する冠動脈は内腔に粥状硬化を起こし、血流障害を起こすようになる。初期には自覚症状が無く、次第に狭心症発作を起こすようになるが、虚血性心疾患患者の3～4割はかなり病状が進展してからも症状のない無症候性虚血性心疾患であることが知られている。様々なストレスにより、この冠動脈内粥腫が破綻すると冠動脈内腔に血栓を形成、閉塞を起こし急性心筋梗塞となる。再灌流療法などの治療法の進歩により死亡率は減少したが、現在でも急性期の死亡率は30%近くに達し、その主な原因は心筋壊死に伴う不整脈、ポンプ失調、心破裂などである。また、急性期を過ぎた後も壊死心筋を原因として心筋の再構築 (remodeling) が起こり、心機能の低下が起こる。慢性期にはこれらを原因とした心不全、不整脈などが死因となるため、厳密な薬物治療、生活指導が重要となる。その予後予測を行うことは、その薬物治療、生活指導の方針を決定する上で非常に重要である。また、心筋梗塞の約30%に再発を認めるため、前述のような危険因子の管理が重要となる。

【0003】

このような病態から、虚血性心疾患危険因子群のスクリーニング、同危険因子の管理、早期診断、心筋保護を含めた治療、罹患後の予後予測法、再発予防の重要性が認識されている。虚血性心疾患危険因子群のスクリーニング項目としては、血中コレステロール値、血糖値、血圧の測定、喫煙歴の聴取のほか、低HDLコレステロール血症 (非特許文献1参照)、インスリン抵抗性 (非特許文献2参照)、高ホモシステイン血症 (非特許文献3参照)、酸化LDL (非特許文献4参照) などが知られている。予後予測法としては核種トレーサーを用いた核医学的手法が現在主に用いられている。また、薬物治療としては抗血小板薬、冠動脈拡張薬の他、アンギオテンシン転換酵素阻害薬 (非特許文献5参照) などが用いられている。しかし現在なお、虚血性心疾患危険因子群のスクリーニング、治療は十分ではない。また、予後予測のための核医学的手法は経済的負担が大きく、施行可能な設備が限られている。

【0004】

脳由来神経栄養因子 (以下、BDNFと略称する) は、脳内で発見された神経栄養因子の一つであり、脳内神経回路網の形成や発達、さらにはその生存維持に重要な役割を果たしていることが判明している。また、1990年代後半には、BDNFはシナプスの可塑性にも関与し、記憶や学習にも重要な役割を果たしていることが知られており、また神経細胞死に対して神経保護作用も有する事が報告されている。最近、さらにこのBDNFは神経系のみならず心血管系において重要な役割を果たしていることが報告されている。最近の遺伝子改変動物を用いた研究により、BDNFは冠動脈内皮細胞の安定に重要であり、血管新生に関係していることが示唆されている (非特許文献6参照)。また、血管内皮自身がBDNFを合成、分泌しており、血管障害、心筋虚血によりBDNFの合成、発現は促進されることも報告されている (非特許文献7および8参照)。その他、BDNFは高脂血症による血管内皮障害に保護的に働く可能性があることや (非特許文献9参照)、BDNFの低下は、耐糖能異常、脂質代謝異常などを示し動脈硬化に促進的に働く代謝性

症候群 (metabolic syndrome) の病状を進展させる可能性などが示唆されている (非特許文献 10 参照)。しかしながら虚血性心疾患における BDNF の役割等については報告がない。

【非特許文献 1】 Atheroscler. Tromb. Vasc. Biolo. (1995) 15: 431-440

【非特許文献 2】 Diabetes (1988) 37: 1595-1607

【非特許文献 3】 JAMA (1992) 268: 877-881

【非特許文献 4】 J. Clin. Invest. (1991) 88: 1785-1792

【非特許文献 5】 Eur. Heart. J. (1998) 19: A12-A19

【非特許文献 6】 Development (2000) 127: 4531-4540

【非特許文献 7】 FASEB (2000) ;470: 113-117

【非特許文献 8】 Journal of pathology (2001) 194: 247-253

【非特許文献 9】 Arch. Physiol. Biochem. (2001) 109: 357-360

【非特許文献 10】 J. Urol. (2003) 169: 1577-1578

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

虚血性心疾患は前述したとおり、日本における主な死因のひとつであり、現在もなお、患者数が増加している疾患であるが、無症状に進行することも多く、そのスクリーニングも十分でなく、治療法も十分ではない。また罹患後の治療方針決定のための予後予測法も十分ではない。従って医療現場から虚血性心疾患の危険因子を早期診断できる診断薬、診断方法、治療薬、簡便な予後予測法の開発が望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行なった結果、虚血性心疾患の患者の血清中 BDNF のレベルが、健常者のそれと比較して有意に低下していることを見出し、その違いを利用することにより、抗脳由来神経栄養因子抗体 (以下、「抗 BDNF 抗体」という) を用いて虚血性心疾患危険群の診断が可能となることを見出した。本発明は、かかる知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は下記の態様の発明を提供するものである。

1. 抗 BDNF 抗体を含有する虚血性心疾患危険群診断薬。
2. 血液中の BDNF の濃度を測定するためのものである上記 1 に記載の虚血性心疾患危険群診断薬。
3. 抗 BDNF 抗体および標識化抗 BDNF 抗体を含む上記 1 または 2 に記載の虚血性心疾患危険群診断薬。
4. 抗 BDNF 抗体および標識化剤を含有する虚血性心疾患危険群の診断キット。
5. 血液中の BDNF の濃度を測定するためのものである上記 4 に記載の虚血性心疾患危険群の診断用キット。
6. 抗 BDNF 抗体および標識化抗 BDNF 抗体を含む上記 4 または 5 に記載の虚血性心疾患危険群の診断キット。
7. 血液中の BDNF の濃度を測定することを特徴とする虚血性心疾患危険群の検定方法。
8. 抗 BDNF 抗体を用いて BDNF の濃度を測定するものである上記 7 に記載の虚血性心疾患危険群の検定方法。
9. 抗 BDNF 抗体および標識化抗 BDNF 抗体を用いて BDNF の濃度を測定するものである上記 7 に記載の虚血性心疾患危険群の検定方法。
10. 血液中の BDNF の濃度を測定することを特徴とする虚血性心疾患の治療薬の検定方法。
11. BDNF を増加させる化合物を含有する虚血性心疾患の治療薬。
12. BDNF を含有する虚血性心疾患の治療薬。

【発明の効果】

【0007】

本発明の虚血性心疾患危険群の診断薬を用いれば、血液中のBDNFを測定することによって、冠動脈硬化症、狭心症、急性および陳旧性心筋梗塞等の虚血性心疾患危険群が正確に診断できる。特に、抗BDNF抗体と標識化抗BDNF抗体とを用いて患者血液中のBDNFの濃度を測定することによって該診断が容易に行われる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明の虚血性心疾患危険群診断薬、診断キット、虚血性心疾患危険群の検定方法、虚血性心疾患治療薬およびその検定方法について以下に詳細に説明する。

【0009】

本明細書における用語の意味あるいは定義は以下のとおりである。

「抗脳由来神経栄養因子抗体(抗BDNF抗体)」とは、BDNFを抗原として得られる抗体をいう。該抗体は、BDNFに結合する能力があればよく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、さらに遺伝子組み換え技術によって得られる抗体を含む。また必要により当該抗体は、精製や化学修飾を施したものであっても、F(ab')₂など断片化したものであっても良い。好ましいものとしては、特異的にBDNFに結合するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等が挙げられる。当該抗BDNFモノクローナル抗体としては市販されているものを使用することができる。

【0010】

「標識化抗脳由来神経栄養因子抗体(標識化抗BDNF抗体)」とは、抗BDNF抗体にペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素等の酵素、蛍光性物質、放射性同位元素または同位元素等を結合させて標識し、試料中のBDNFを検出できるように工夫された抗体をいう。さらに「標識化抗BDNF抗体」には、ビオチン、2,4-ジニトロフェノール等で修飾した抗BDNF抗体も含まれる。これらビオチン、2,4-ジニトロフェノール等で修飾した抗BDNF抗体を使用する際には、該標識化抗BDNF抗体に加え、さらに、標識化したアビジン、標識化した抗2,4-ジニトロフェノール抗体を用いることで、高感度に試料中のBDNFを検出することができる。

【0011】

「虚血性心疾患」とは、冠動脈硬化症、狭心症、急性および陳旧性心筋梗塞を含み、壮年期以降の男女に多く、生命維持に必要な心臓の重篤な障害をいう。冠動脈硬化症の特徴は、心臓を栄養する冠動脈内の動脈硬化であり、狭心症の特徴は、冠動脈血流障害による胸痛発作であり、心筋梗塞の特徴は冠動脈血流障害による心筋壊死と、それに付随する不整脈、心不全、心破裂、ポンプ失調などの致命的な合併症である。重要臓器である心臓への血流障害はこれら虚血性心疾患の本質的な特徴である。

【0012】

本発明による虚血性心疾患危険因子群の診断は、例えばヒトの血液中のBDNF量を測定することによって行なうことができる。具体的には、ヒトの血液から血清を調製し、血清中のBDNFの量を種々の方法により測定する。血液中のBDNF量の測定は、抗BDNF抗体を用いた免疫学的方法が好ましく、抗BDNF抗体と標識化抗BDNF抗体とを用いた免疫学的方法がより好ましく、望ましくはBDNFに対して特異性の高い抗体を用いたサンドイッチELISAによってBDNFを検出・定量することである。

【0013】

より具体的には、固相化抗BDNF抗体に検体である血清を接触させ、固相を洗浄後標識化抗BDNF抗体を接触させ、該標識を用いてBDNF量を測定する方法が好ましい。ここで標識化抗BDNF抗体としては、前記の如く直接測定可能な標識体で標識したもの、ビオチンとアビジンの組み合わせや2,4-ジニトロフェノールとその抗体との組み合わせも挙げられる。

【0014】

具体的な血液中のBDNFを測定する方法としては、例えば

1. ポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、セファロース等の固相に抗BDNF抗体を固定する工程；
 2. 診断する患者の血清を固相に加える、または接触させる工程；
 3. 固相を洗浄する工程；
 4. 標識化された抗BDNF抗体を加える、または接触させる工程；
 5. 該標識を用いてBDNFの量を測定する工程；
- からなる方法等が挙げられる。

【0015】

さらに、具体的な血清中のBDNFを測定する方法としては、例えば、

1. ポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、セファロース等の固相に抗BDNF抗体を固定する工程；
 2. 診断する患者の血清を固相に加える、または接触させる工程；
 3. 固相を洗浄する工程；
 4. ビオチンまたは2,4-ジニトロフェノールで修飾した抗BDNF抗体を加える、または接触させる工程；
 5. 標識化アビジンまたは標識化2,4-ジニトロフェノール抗体を加える、または接触させる工程；
 6. 該標識を用いてBDNFの量を測定する工程；
- からなる方法等が挙げられる。

【0016】

さらに、具体的な血清中のBDNFを測定する方法としては、例えば、

1. ポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、セファロース等の固相に抗BDNF抗体を固定する工程；
 2. 診断する患者の血液を固相に加える、または接触させる工程；
 3. 固相を洗浄する工程；
 4. ビオチンで修飾した抗BDNF抗体を加える、または接触させる工程；
 5. 標識化アビジンを加える、または接触させる工程；
 6. 該標識を用いてBDNFの量を測定する工程；
- からなる方法等が挙げられる。

【0017】

固相の形状として小球、ウェル、試験管等が挙げられる。

【0018】

抗原またはELISAのスタンダードとして用いるBDNFは、市販されているものを使用することができる他、生物材料からの精製あるいは遺伝子工学的的手法により調製することができる。遺伝子工学的的手法を用いる場合、BDNFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適切な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換の培養上清から目的とする組換えBDNFを得ることができ、均質で多量のBDNFの生産に好適である。上記宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草菌、酵母、植物または動物細胞を用いることができる。

【0019】

抗BDNF抗体は、BDNFを抗原として、ウサギ、ニワトリ、シチメンチョウなどに免疫することにより調製される。標識化抗BDNF抗体は、汎用される方法のほか、市販されているビオチン化試薬や架橋剤付きペルオキシダーゼ等を用いて調製することができる。

【0020】

虚血性心疾患者の血液中BDNF濃度は健常者のそれより有意に低いので、上記の手段により血液中のBDNF量を測定し、健常者のそれと比較すれば、虚血性心疾患の危険度が高いことが診断できる。

【0021】

本発明の虚血性心疾患危険群診断薬または診断薬キットは、抗BDNF抗体、抗BDN

F抗体および標識化剤、あるいは抗BDNF抗体および標識化抗BDNF抗体を含むものであればよい。

【0022】

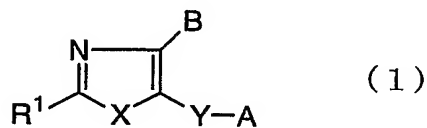
本発明方法は、また虚血性心疾患の治療薬の検定にも有用である。すなわち、虚血性心疾患治療薬の治療効果を検定することもできる。また、BDNFを増加させる作用を有する化合物は、虚血性心疾患の治療薬として有用である可能性がある。また、BDNFの量が低いモデル動物(マウスやラットなど)は、虚血性心疾患の動物モデルとしても有用である。従って、この検定方法を利用することにより、新しい虚血性心疾患の治療薬のスクリーニングも行なうことが可能である。

【0023】

このような方法で見出される治療薬には、非経口的または経口的に投与できる薬物が含まれ得る。虚血性心疾患の治療薬としては、BDNF自身の他、下記式(1)：

【0024】

【化1】



【0025】

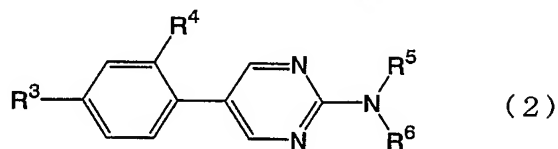
(式中、R¹はハロゲン原子、置換されていてもよい複素環基、置換されていてもよいヒドロキシ基、置換されていてもよいチオール基または置換されていてもよいアミノ基を、Aは置換されていてもよいアシル基、置換されていてもよい複素環基、置換されていてもよいヒドロキシ基またはエステル化もしくはアミド化されていてもよいカルボキシル基を、Bは置換されていてもよい芳香族基を、Xは酸素原子、硫黄原子または置換されていてもよい窒素原子を、Yは2価の炭化水素基または複素環基を示す。)で表されるアゾール誘導体(特開平2001-131161)が例示される。

【0026】

また、下記式(2)：

【0027】

【化2】



【0028】

(式中、R³およびR⁴はそれぞれハロゲン原子であり、R⁵およびR⁶はそれぞれ水素原子、炭素原子数1～5のアルキル基、炭素原子数1～3のアルキルスルフォニル基またはアセチルアミノアルキル基である。)で表される5-フェニルピリミジン化合物およびその塩(特開平8-3142)が例示される。

【0029】

さらに、カテコール誘導体(Furukawa, Y., J. Biol. Chem., 261巻, 6039頁(1986年)、特開昭63-83020、特開昭63-156751、特開平2-53767、特開平2-104568、特開平2-149561、特開平3-99046、特開平3-83921、特開平3-86853、特開平5-32646)、キノン誘導体(特開平3-81218、特開平4-330010、特開平7-285912)、グルタミン酸誘導体(特開平7-228561)、不飽和脂肪酸誘導体(特開平8-143454)、オイデスマン誘導体(特開平8-73395)、縮環系オキサゾール誘導体(特開平8-175992)、カルバゾール誘導体(特開平8-169879)、インドール誘導体(特開平7-118152、特開平8-239362)、天然物由来のテルペン誘導体(特開平7-149633、

特開平8-319289)、プリン誘導体であるレテプリニム(NeuroTherapeutics社、米国)などが挙げられる。

【0030】

これらの化合物のうち、2-アミノ-5-(2,4-ジクロロフェニル)ピリミジン(Biochemical Pharmacology 66 (2003) 1019-1023)および4-(4-クロロフェニル)-2-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)-5-[3-(2-メトキシフェノキシ)プロピル]-1,3-オキサゾール(Chem. Pharm. Bull. 51(5) 565-573 (2003)が好ましい。

【0031】

これら虚血性心疾患治療薬の正確な投与量および投与計画は、個々の治療対象毎の所要量、治療方法、疾病または必要性の程度、および薬物の種類によって異なり、また当然医師の判断による必要がある。例えば、BDNFの場合について言えば、非経口的投与する場合の投与量、投与回数は症状、年齢、体重、投与形態等によって異なるが、例えば注射剤として皮下または静脈に投与する場合、成人の患者の体重1kg、一日当たり約0.1mg~約2500mgの範囲、好ましくは約1mg~約500mgの範囲から投与量が選択され、例えば噴霧剤として気管に投与する場合、成人の患者の体重1kg、一日当たり約0.1mg~約2500mgの範囲、好ましくは約1mg~約500mgの範囲から投与量が選択される。投与計画としては、連日投与または間欠投与またはその組み合わせがある。経口的投与する場合の投与量、投与回数は症状、年齢、体重、投与形態等によって異なるが、例えば、成人の患者の体重1kg、一日当たり約0.5mg~約2500mgの範囲、好ましくは約1mg~約1000mgの範囲から投与量が選択される。

【0032】

本発明の虚血性心疾患の治療薬を薬学的に許容しうる非毒性の担体と混和することにより医薬組成物を製造することができる。このような組成物を、非経口投与用(皮下注射、筋肉注射、または静脈注射)に調製する場合は、特に溶液剤形または懸濁剤形がよく、膣または直腸投与用の場合は、特にクリームまたは坐薬のような半固形型剤形がよく、経鼻腔投与用の場合、特に粉末、鼻用滴剤、またはエアロゾル剤形がよい。

【0033】

組成物は一回量投与剤形で投与することができ、また例えばレミントンの製薬科学(マック・パブリッシング・カンパニー、イーストン、PA、1970年)に記載されているような製薬技術上良く知られているいずれかの方法によって調製できる。注射用製剤は医薬担体として、例えば、アルブミン等の血漿由来蛋白、グリシン等のアミノ酸、マンニトール等の糖を加えることができる。注射剤形で用いる場合にはさらに緩衝剤、溶解補助剤、等張剤等を添加することもできる。また、水溶製剤、凍結乾燥製剤として使用する場合、凝集を防ぐためにTween 80(登録商標)、Tween 20(登録商標)などの界面活性剤を添加するのが好ましい。また注射剤以外の非経口投与剤形は、蒸留水または生理食塩液、ポリエチレングリコールのようなポリアルキレングリコール、植物起源の油、水素化したナフタレン等を含有してもよい。例えば坐薬のような膣または直腸投与用の製剤は、一般的な賦形剤として例えばポリアルキレングリコール、ワセリン、カカオ油脂等を含有する。膣用製剤では、胆汁塩、エチレンジアミン塩、クエン酸塩等の吸収促進剤を含有してもよい。吸入用製剤は固体でも良く、賦形剤として例えばラクトースを含有してもよく、また経鼻腔滴剤は水または油溶液であってもよい。

【実施例】

【0034】

以下に、本発明の実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

【0035】

実施例1

(1)被験者

後記表1に示す虚血性心疾患の患者39名(男性29名、女性10名、平均年齢:65

0歳(標準偏差9.4)、年齢範囲:34歳~82歳)、ならびに同一年齢層の健康者33名(男性11名、女性22名、平均年齢:68.3歳(標準偏差12.0)、年齢範囲:35歳~82歳)を正常対照として被験者に選んだ。虚血性心疾患のすべての患者は心臓カテーテル法による冠動脈造影を施行し、冠動脈に動脈硬化による有意な冠動脈狭窄を確認することで診断した。冠動脈造影上定量的評価法により50%以上の狭窄をもって有意狭窄とした。実験対象すべてに対して冠動脈の危険因子である高脂血症、糖尿病、高血圧の治療歴、および喫煙歴について調査した。高脂血症については、日本動脈硬化学会の診断基準、すなわち血清脂質のうち総コレステロール220mg/dl以上、LDLコレステロール140mg/dl以上、HDLコレステロール40mg/dl未満、トリグリセリド150mg/dl以上、を満たすことにより診断した。糖尿病については、日本糖尿病学会の診断基準、すなわち空腹時静脈血漿グルコース濃度が126mg/dl以上、75gブドウ糖負荷試験(OGTT)の2時間値200mg/dl以上、または随時血糖値200mg/dl以上、を満たすことにより診断した。高血圧症については、国際高血圧学会の診断基準、すなわち収縮期血圧140mmHg以上または拡張期血圧90mmHg以上、を満たすことによって診断した。すべての被験者に対して、自覚症状をCCS(Canadian Cardiovascular Society)分類にて付した。CCS分類は狭心症の労作時症状を重症度に応じて4段階に分類したものである(例えばCampeau, L. 著、Grading Angina pectoris. Circulation (1976) 54: 522参照)。

【0036】

(2) 試験方法

被験者の血清検体を採取し、測定まで-80℃で保存した。BDNFの血清レベルはBDNF測定キット(「BDNF Emax^(R) ImmunoAssay Systems」、プロメガ社、米国)を用い、製造者の指示に従って測定した。すなわち、抗BDNFモノクローナル抗体を96穴プレートにコーティングし、4℃で18時間インキュベーションした。プレートをブロッキング緩衝液にて室温で1時間ブロッキング処理した。緩衝液で洗浄した後、希釈した血清100μLを添加した。定量用のスタンダードとして、ヒトBDNF(78-5000pg/mL)を添加したものをを用いた。室温で2時間反応させた後、緩衝液で5回洗浄し、抗ヒトBDNF抗体を添加し室温で2時間反応させた。緩衝液で5回洗浄した後、ワサビペルオキシダーゼ標識抗IgY抗体(100μL)を添加し、室温で1時間反応させた。次に、緩衝液で5回洗浄した後、TMB溶液(100μL)を添加し、室温で10分間反応させた後、停止液(1M塩酸:100μL)を添加して反応を止め、30分以内に450nm波長での吸光度を自動マイクロプレートリーダー(Emax、モレキュラーデバイス、米国)で測定した。検体中のBDNFの含量をサンドイッチ型ELISA法にて測定し、検量線からそのBDNFの濃度を算出した。また、これと同時にすべての被験者において血圧、血糖値、グリコヘモグロビン(HbA_{1c})値、血清総コレステロール値、血清LDLコレステロール値を測定した。

【0037】

(3) 統計分析

データは平均値±標準偏差で示した。2群間の統計分析はスチューデントt-テストを用いて行った。変数間の関係はピアソンの積率相関係数で確認した。多群の差は一元配置分散分析(ANOVA)で解析した。自覚症状間の多重比較のため、ボンフェロニ・ダンテストを行った。0.05以下のp値を統計的に有意とした。

【0038】

(4) 結果

表1に虚血性心疾患患者の特徴および上記実験結果を示す。

【0039】

【表1】

| 番号 | 年齢 | 性別 | 疾患 | BDNF値 (ng/ml) | 合併症 (1:有り, 0:無し) | | | | 血圧(mmHg) | | 生化学検査 (mg/dl) | | | | | 自覚症状 CCS |
|----|----|----|-----|------------------|------------------|------|-----|-----|----------|-----|---------------|-------|-------|-----|-----|-------------|
| | | | | | 糖尿病 | 高脂血症 | 高血圧 | 喫煙歴 | SBP | DBP | BS | HbA1c | T-cho | TG | LDL | |
| 1 | 67 | 男 | AMI | 15.4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 120 | 80 | 120 | 4.6 | 141 | 58 | 89 | I |
| 2 | 71 | 男 | AP | 14.5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 148 | 86 | 156 | 6.3 | 169 | 81 | 113 | なし |
| 3 | 71 | 男 | OMI | 33.2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 130 | 80 | 95 | 5.1 | 134 | 55 | 110 | II |
| 4 | 54 | 男 | AMI | 41.9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 104 | 64 | 78 | 7.2 | 150 | 162 | 88 | I |
| 5 | 74 | 男 | AP | 13.1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 158 | 75 | 205 | 7.2 | 175 | 132 | 106 | I |
| 6 | 70 | 女 | AP | 5.6 | 1 | 1 | 1 | 0 | 138 | 70 | 199 | 8.2 | 199 | 178 | 133 | I |
| 7 | 59 | 男 | OMI | 17.8 | 0 | 1 | 1 | 1 | 110 | 66 | 73 | 5.5 | 149 | 122 | 98 | I |
| 8 | 66 | 男 | OMI | 25.5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 130 | 78 | 187 | 5.3 | 166 | 141 | 109 | I |
| 9 | 82 | 女 | AP | 9.2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 142 | 66 | 200 | 6.2 | 148 | 144 | 97 | I |
| 10 | 56 | 男 | OMI | 27.9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 102 | 57 | 88 | 4.2 | 191 | 137 | 126 | なし |
| 11 | 67 | 男 | AP | 15.2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 158 | 96 | 88 | 5.4 | 202 | 242 | 135 | I |
| 12 | 69 | 女 | OMI | 29.2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 106 | 74 | 111 | 5.1 | 205 | 54 | 138 | I |
| 13 | 65 | 男 | AMI | 22.5 | 0 | 0 | 0 | 1 | 124 | 72 | 116 | 5 | 183 | 134 | 120 | I |
| 14 | 64 | 男 | AP | 23.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 140 | 88 | 108 | 5.1 | 182 | 112 | 121 | II |
| 15 | 80 | 男 | AP | 18.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 110 | 69 | 155 | 5.4 | 164 | 150 | 123 | I |
| 16 | 62 | 女 | AP | 11.8 | 0 | 0 | 1 | 1 | 132 | 80 | 142 | 6 | 237 | 240 | 160 | I |
| 17 | 74 | 男 | AMI | 19.2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 144 | 82 | 124 | 5.2 | 195 | 180 | 126 | I |
| 18 | 77 | 女 | AP | 29.2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 150 | 58 | 140 | 7 | 152 | 106 | 95 | I |
| 19 | 68 | 男 | OMI | 16.9 | 0 | 1 | 0 | 1 | 100 | 62 | 86 | 4.7 | 164 | 111 | 107 | I |
| 20 | 48 | 男 | AMI | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 106 | 68 | 90 | 4.8 | 201 | 147 | 132 | I |
| 21 | 68 | 女 | AP | 24.9 | 0 | 1 | 0 | 0 | 156 | 76 | 114 | 5.7 | 215 | 84 | 149 | I |
| 22 | 60 | 男 | OMI | 8.6 | 0 | 1 | 1 | 0 | 92 | 60 | 117 | 4.8 | 162 | 88 | 109 | II |
| 23 | 55 | 男 | OMI | 28.1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 90 | 60 | 138 | 5.4 | 173 | 125 | 112 | I |
| 24 | 63 | 男 | OMI | 23.1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 89 | 63 | 84 | 4.5 | 206 | 106 | 127 | I |
| 25 | 75 | 男 | AMI | 18.6 | 0 | 1 | 0 | 1 | 148 | 72 | 122 | 4.7 | 234 | 90 | 151 | II |
| 26 | 63 | 男 | OMI | 38 | 1 | 1 | 1 | 1 | 134 | 82 | 195 | 6.1 | 208 | 220 | 133 | I |
| 27 | 66 | 男 | OMI | 18.2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 104 | 64 | 99 | 4.7 | 171 | 96 | 107 | I |
| 28 | 60 | 男 | AP | 23.5 | 0 | 1 | 1 | 1 | 142 | 70 | 107 | 4.9 | 237 | 201 | 153 | I |
| 29 | 69 | 男 | OMI | 22.9 | 1 | 1 | 0 | 0 | 152 | 80 | 102 | 5.1 | 185 | 84 | 121 | I |
| 30 | 63 | 男 | OMI | 26.1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 136 | 82 | 116 | 6.6 | 127 | 118 | 65 | I |
| 31 | 70 | 女 | AP | 20.3 | 0 | 1 | 0 | 1 | 108 | 72 | 114 | 5.4 | 190 | 116 | 118 | I |
| 32 | 47 | 男 | AP | 29.4 | 0 | 1 | 1 | 1 | 140 | 62 | 140 | 4.8 | 209 | 140 | 148 | なし |
| 33 | 34 | 男 | OMI | 35.9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 110 | 62 | 174 | 5.4 | 112 | 130 | 72 | なし |
| 34 | 72 | 男 | AP | 37.6 | 0 | 1 | 1 | 1 | 102 | 76 | 98 | 5.1 | 197 | 190 | 133 | なし |
| 35 | 78 | 女 | AP | 22.8 | 0 | 1 | 1 | 0 | 120 | 60 | 99 | 5 | 254 | 64 | 155 | なし |
| 36 | 59 | 男 | AMI | 37 | 1 | 0 | 0 | 0 | 102 | 64 | 240 | 7.8 | 169 | 81 | 109 | なし |
| 37 | 67 | 女 | OMI | 16.2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 136 | 82 | 157 | 5.5 | 159 | 181 | 91 | I |
| 38 | 55 | 女 | OMI | 7.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 110 | 80 | 138 | 4.6 | 224 | 219 | 146 | I |
| 39 | 63 | 男 | OMI | 12.7 | 0 | 0 | 0 | 1 | 104 | 59 | 120 | 5.2 | 212 | 342 | 139 | なし |

AMI;急性心筋梗塞、OMI;陳旧性心筋梗塞、AP;狭心症、CCS;Canadian Cardiovascular Society

【0040】

i) 全被験者における血清BDNFの濃度

正常対照(NC)、虚血性心疾患(IHD)の被験者における血清BDNF濃度の散布状態を図1に示す。

スチューデントt-テストの結果、虚血性心疾患でのBDNF血清レベル(平均値: 21.6 ng/mL [標準偏差: 9.6])は正常対照での平均値: 33.2 ng/mL [標準偏差: 11.4], $p < 0.0001$)よりも有意に低いことが判明した。NC群とIHD群($n = 72$)を総合して、血清BDNF値と年齢間に有意な相関($r = -0.120$, $p = 0.317$)はなかった。また、NC群とIHD群を総合して男性($n = 40$)のBDNF血清レベル(平均値: 25.8 ng/mL [標準偏差: 11.2])と女性の($n = 32$)のBDNF血清レベル(平均値: 28.4 ng/mL [標準偏差: 12.7])は有意に違わなかった(スチューデントt-テスト、 $p = 0.347$)。

【0041】

ii) 血清BDNFと糖尿病

虚血性心疾患患者のうち、糖尿病の既往歴のある者($n = 14$)の血清BDNFレベル(平均値: 19.8 ng/mL [標準偏差: 7.7])と糖尿病の既往歴の無い者($n = 25$)の血清BDNFレベル(平均値: 25.0 ng/mL [標準偏差: 11.7])の比較を図2に

示す。両群間のBDNF血清レベルは有意に違わなかった(スチューデントt-テスト、 $p = 0.102$)。また、虚血性心疾患患者の血清BDNF値と血糖値の相関関係を図3に、全被験者の血清BDNF値とグリコヘモグロビンの相関関係を図4に示す。血清BDNF値と血糖値($r = -0.014$, $p = 0.933$)、グリコヘモグロビン($r = 0.114$, $p = 0.488$)にはいずれも有意な相関はなかった。

【0042】

iii) 血清BDNFと高脂血症

虚血性心疾患患者のうち、高脂血症の既往歴のある者($n = 27$)の血清BDNFレベル(平均値: 22.7 ng/mL [標準偏差: 9.5])と高脂血症の既往歴の無い者($n = 12$)の血清BDNFレベル(平均値: 19.3 ng/mL [標準偏差: 9.7])の比較を図5に示す。両群間のBDNF血清レベルは有意に違わなかった(スチューデントt-テスト、 $p = 0.319$)。また、虚血性心疾患患者の血清BDNF値と血清総コレステロール値の相関関係を図6に、虚血性心疾患患者の血清BDNF値と血清LDLコレステロール値の相関関係を図7に示す。血清BDNF値と血清総コレステロール値($r = -0.205$, $p = 0.210$)、血清LDLコレステロール値($r = -0.190$, $p = 0.246$)にはいずれも有意な相関はなかった。

【0043】

iv) 血清BDNFと高血圧症

虚血性心疾患患者のうち、高血圧症の既往歴のある者($n = 22$)の血清BDNFレベル(平均値: 23.0 ng/mL [標準偏差: 10.6])と高血圧症の既往歴の無い者($n = 17$)の血清BDNFレベル(平均値: 19.9 ng/mL [標準偏差: 8.0])の比較を図8に示す。両群間のBDNF血清レベルは有意に違わなかった(スチューデントt-テスト、 $p = 0.333$)。また、虚血性心疾患患者の血清BDNF値と収縮期血圧の相関関係を図9に、虚血性心疾患患者の血清BDNF値と拡張期血圧の相関関係を図7に示す。血清BDNF値と収縮期血圧($r = -0.112$, $p = 0.458$)、拡張期血圧($r = -0.112$, $p = 0.476$)にはいずれも有意な相関はなかった。

【0044】

v) 血清BDNFと喫煙

虚血性心疾患患者のうち、喫煙の既往歴のある者($n = 22$)の血清BDNFレベル(平均値: 23.3 ng/mL [標準偏差: 8.9])と喫煙の既往歴の無い者($n = 17$)の血清BDNFレベル(平均値: 19.5 ng/mL [標準偏差: 10.3])の比較を図11に示す。両群間のBDNF血清レベルは有意に違わなかった(スチューデントt-テスト、 $p = 0.223$)。

【0045】

vi) 血清BDNFと狭心症状

図12に示すように、虚血性心疾患患者の血清BDNF濃度はCCS分類によって有意な違いは無かった($F = 1.807$, $p = 0.179$)。

【0046】

上記試験結果に見られるように、虚血性心疾患患者の血清BDNF値は同一年齢層の正常対照の値と比べて有意に減少していることがわかった。また、虚血性心疾患患者の血清BDNF値は、糖尿病、高脂血症、高血圧、喫煙の既往により差は見られず、血糖値、グリコヘモグロビン値、血清総コレステロール値、血清LDLコレステロール値、血圧とも直接の関係は認めなかった。さらに、血清BDNF値はCCS分類に基づく狭心症状の自覚とも無関係であった。総合的にすれば、減少した血清BDNF値は虚血性心疾患の病態生理に寄与しているものと考えられる。

【0047】

虚血性心疾患の主たる病態生理は動脈硬化による冠動脈の血流障害である。上記試験における虚血性心疾患患者は、全例で、冠動脈に動脈硬化による有意な狭窄または閉塞を示していた。血清BDNF値の低下は糖代謝、脂質代謝などに悪影響を与えるが、上記試験において血清BDNF値の低下は他の動脈硬化の危険因子となる疾患の既往、これまで知

られた血糖値、グリコヘモグロビン、血清総コレステロール、血清LDLコレステロールなどの危険因子からでは予測できなかった。

【0048】

従って、本試験により、BDNFは虚血性心疾患の病態生理学において極めて重要な役割を果たし、血液中のBDNFは虚血性心疾患危険群の生物学的診断マーカーとして有用であることがわかる。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】正常対照（NC）、虚血性心疾患（IHD）の患者における血清BDNF濃度の散布図である。

【図2】虚血性心疾患患者における糖尿病合併例（DM（+））と糖尿病非合併例（DM（-））における血清BDNF濃度の散布図である。

【図3】虚血性心疾患患者における血清BDNF濃度と血糖値（BS）の間の相関関係を示す。

【図4】虚血性心疾患患者における血清BDNF濃度とグリコヘモグロビン（HbA1c）値の間の相関関係を示す。

【図5】虚血性心疾患患者における高脂血症合併例（HL（+））と高脂血症非合併例（HL（-））における血清BDNF濃度の散布図である。

【図6】虚血性心疾患患者における血清BDNF濃度と血清総コレステロール（Tcho）値の間の相関関係を示す。

【図7】虚血性心疾患患者における血清BDNF濃度と血清LDLコレステロール（LDL）値の間の相関関係を示す。

【図8】虚血性心疾患患者における高血圧合併例（HT（+））と高血圧非合併例（HT（-））における血清BDNF濃度の散布図である。

【図9】虚血性心疾患患者における血清BDNF濃度と収縮期血圧の間の相関関係を示す。

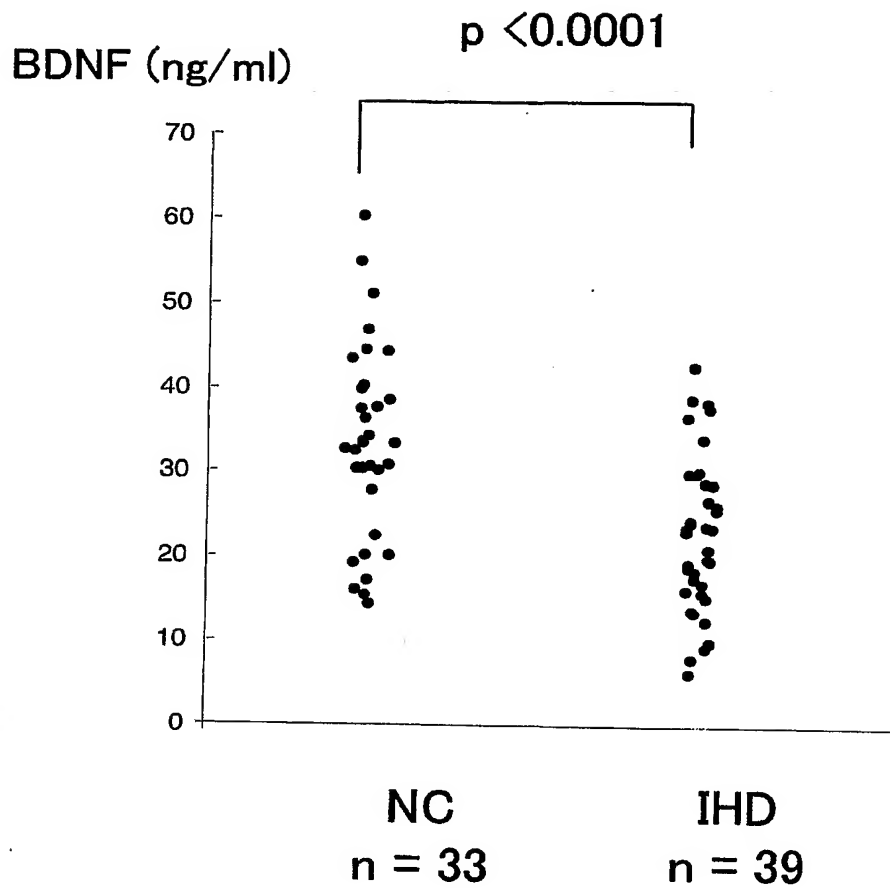
【図10】虚血性心疾患患者における血清BDNF濃度と拡張期血圧の間の相関関係を示す。

【図11】虚血性心疾患患者における喫煙例（喫煙（+））と非喫煙例（喫煙（-））における血清BDNF濃度の散布図である。

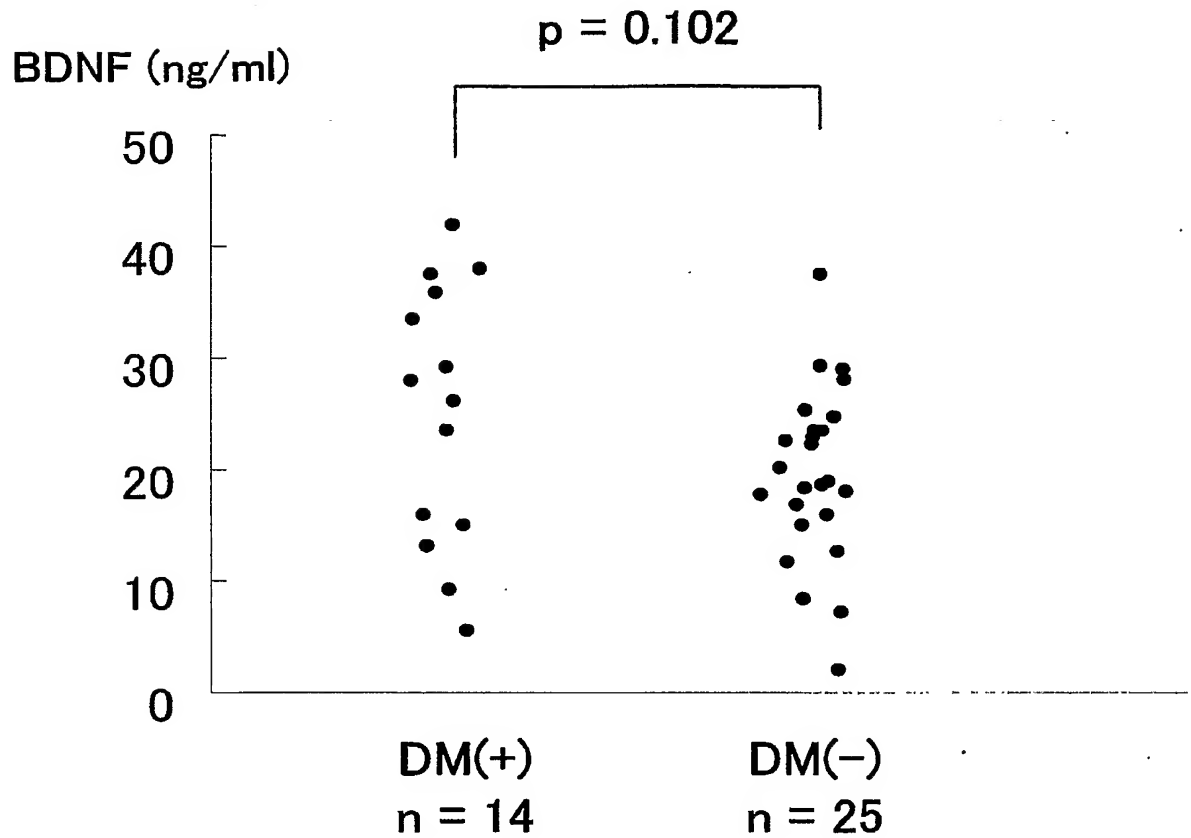
【図12】虚血性心疾患患者におけるCCSスコアによる血清BDNF濃度の違いを示す。

【書類名】 図面

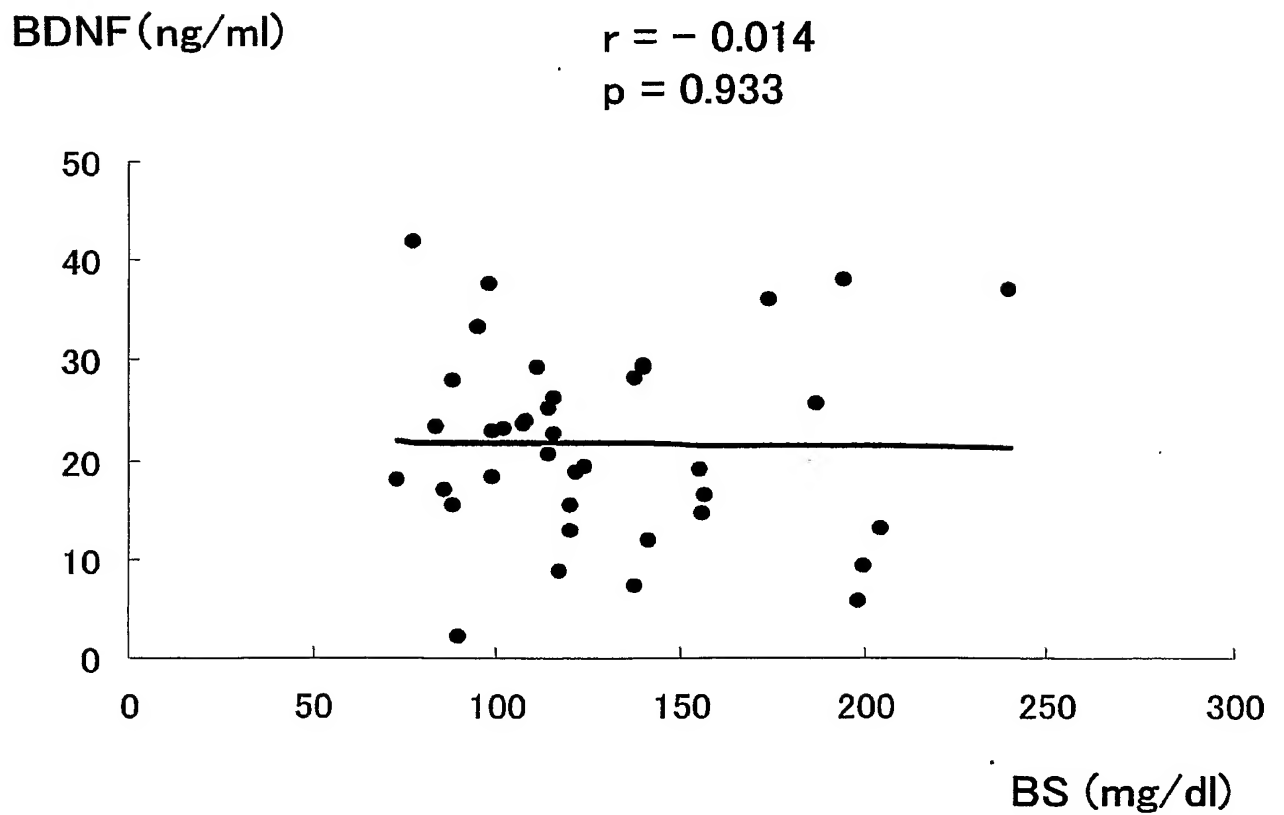
【図 1】



【図 2】



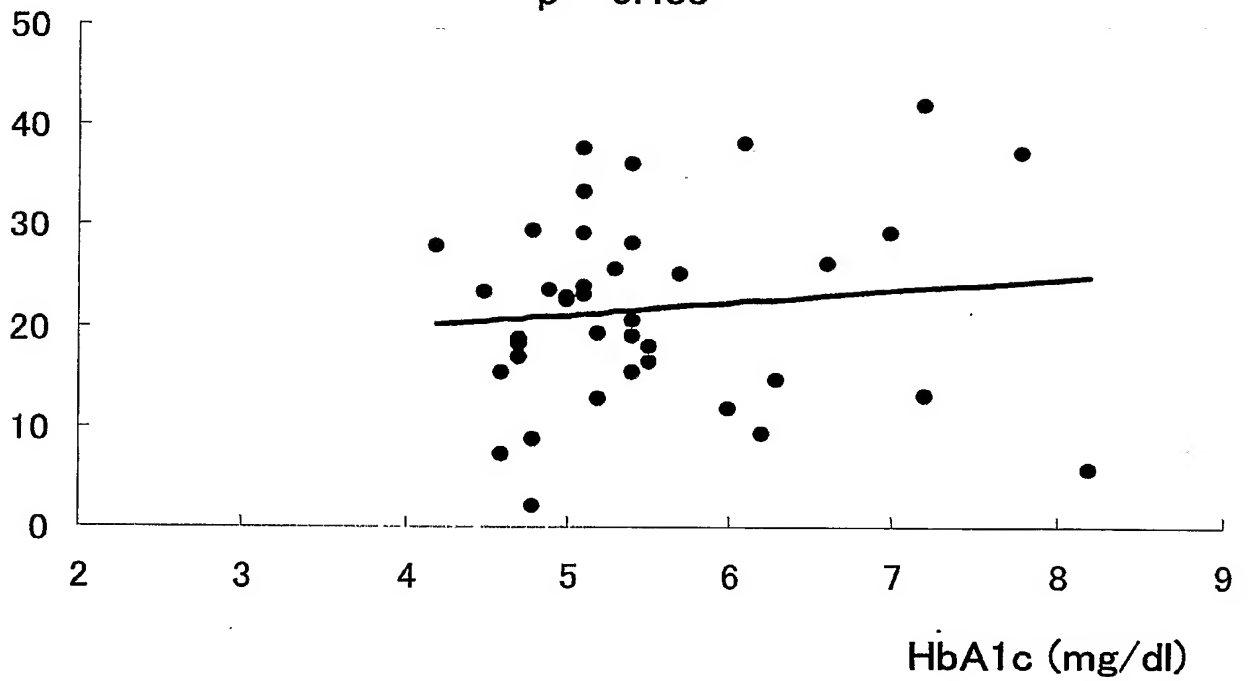
【図 3】



【図 4】

BDNF (ng/ml)

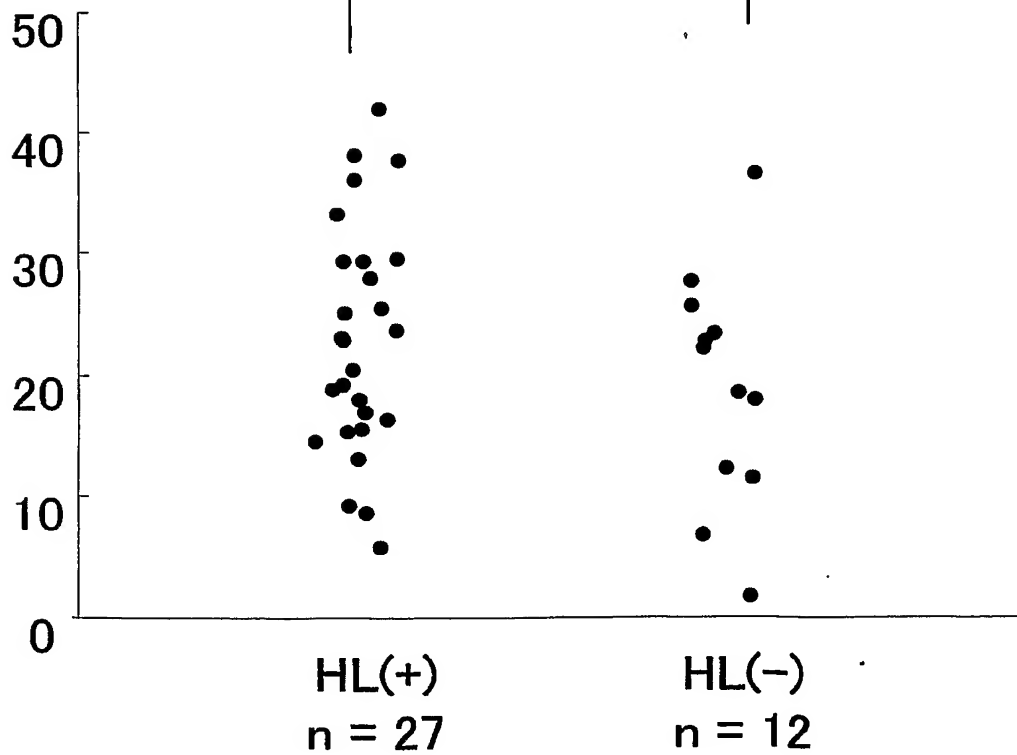
$r = 0.114$
 $p = 0.488$



【図 5】

BDNF (ng/ml)

$p = 0.319$

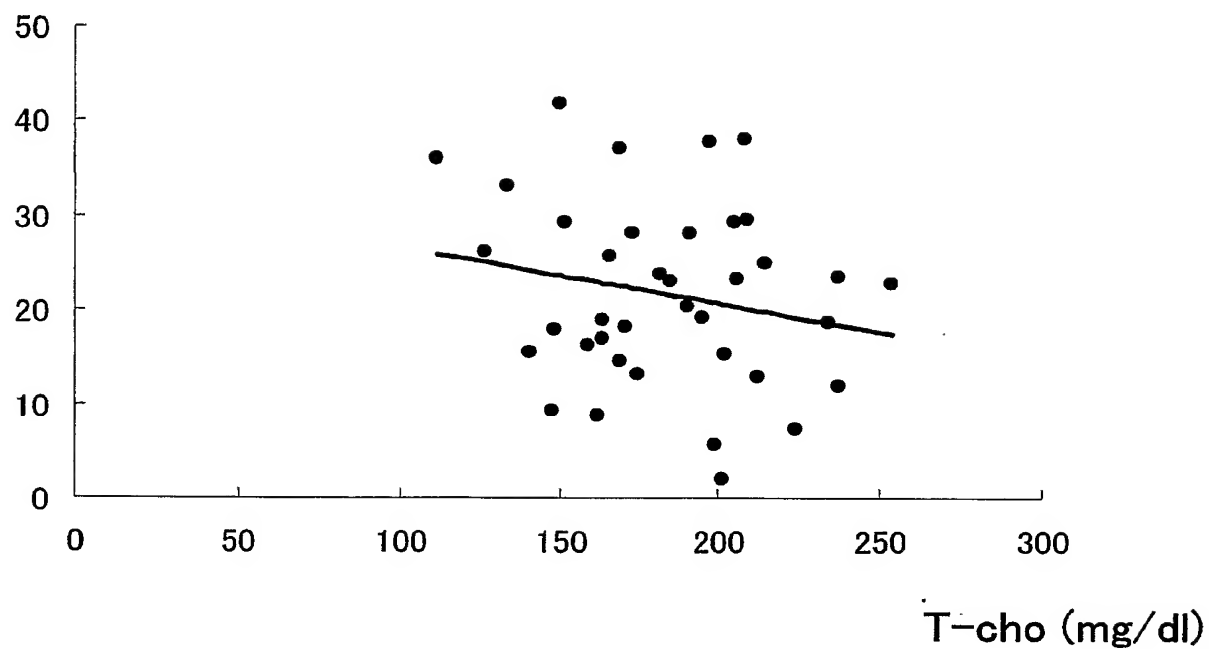


【図 6】

BDNF (ng/ml)

$$r = -0.205$$

$$p = 0.210$$

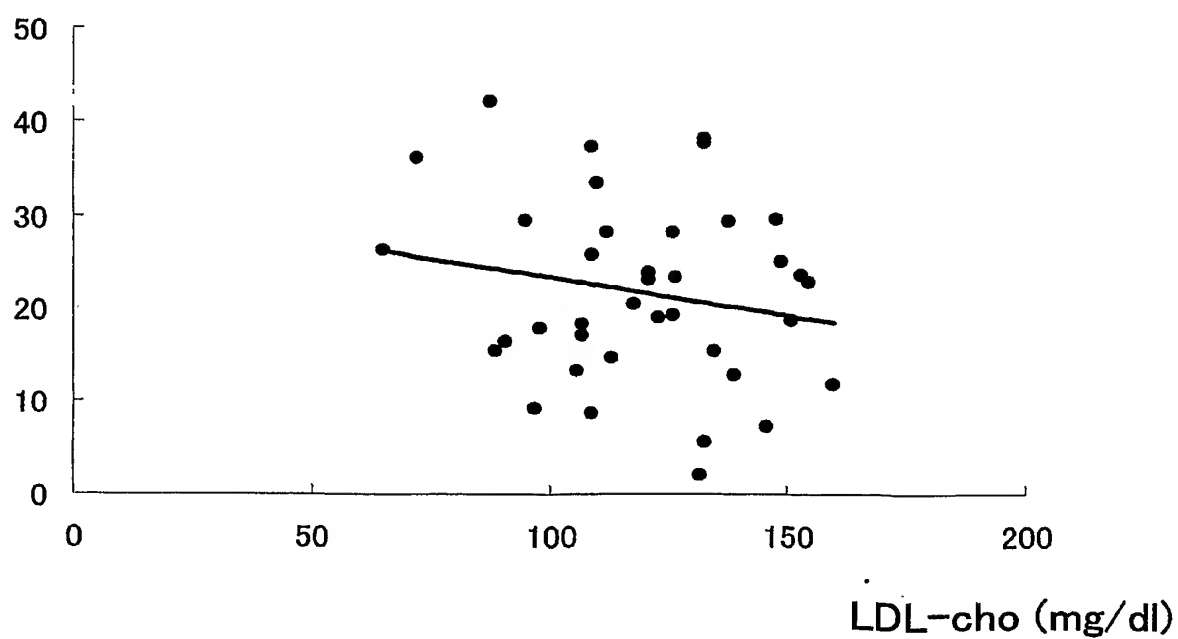


【図 7】

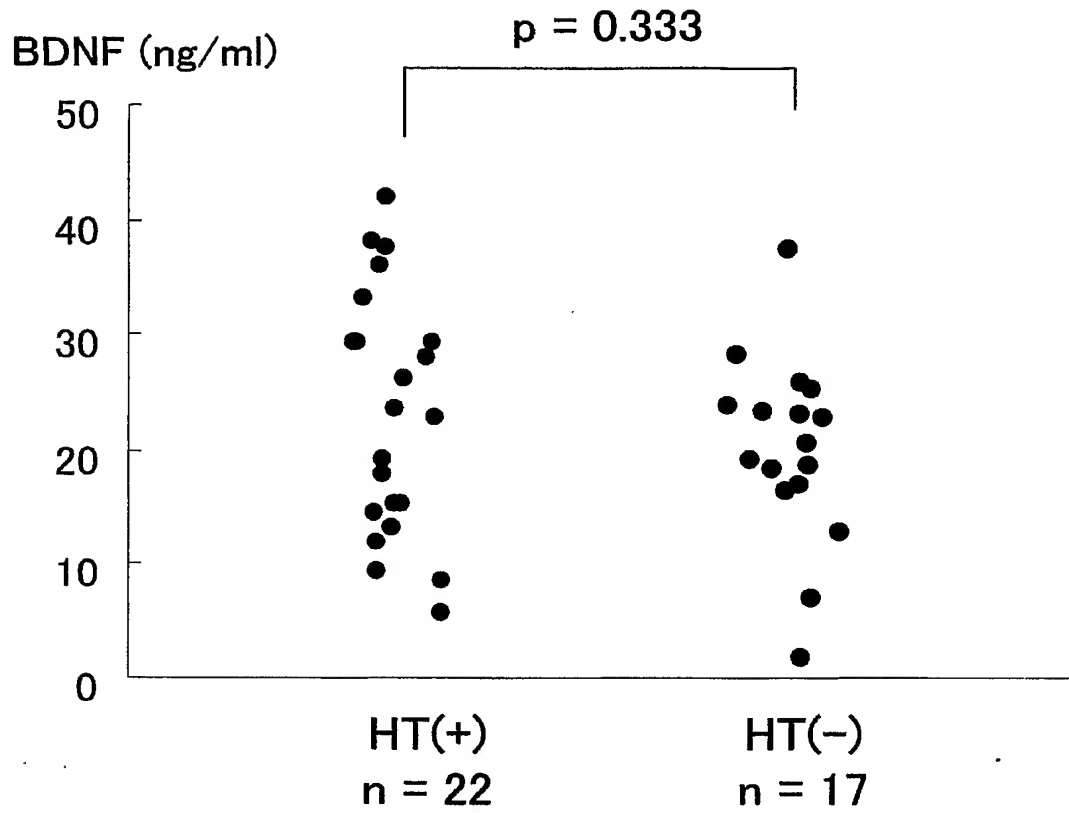
BDNF (ng/ml)

$$r = -0.190$$

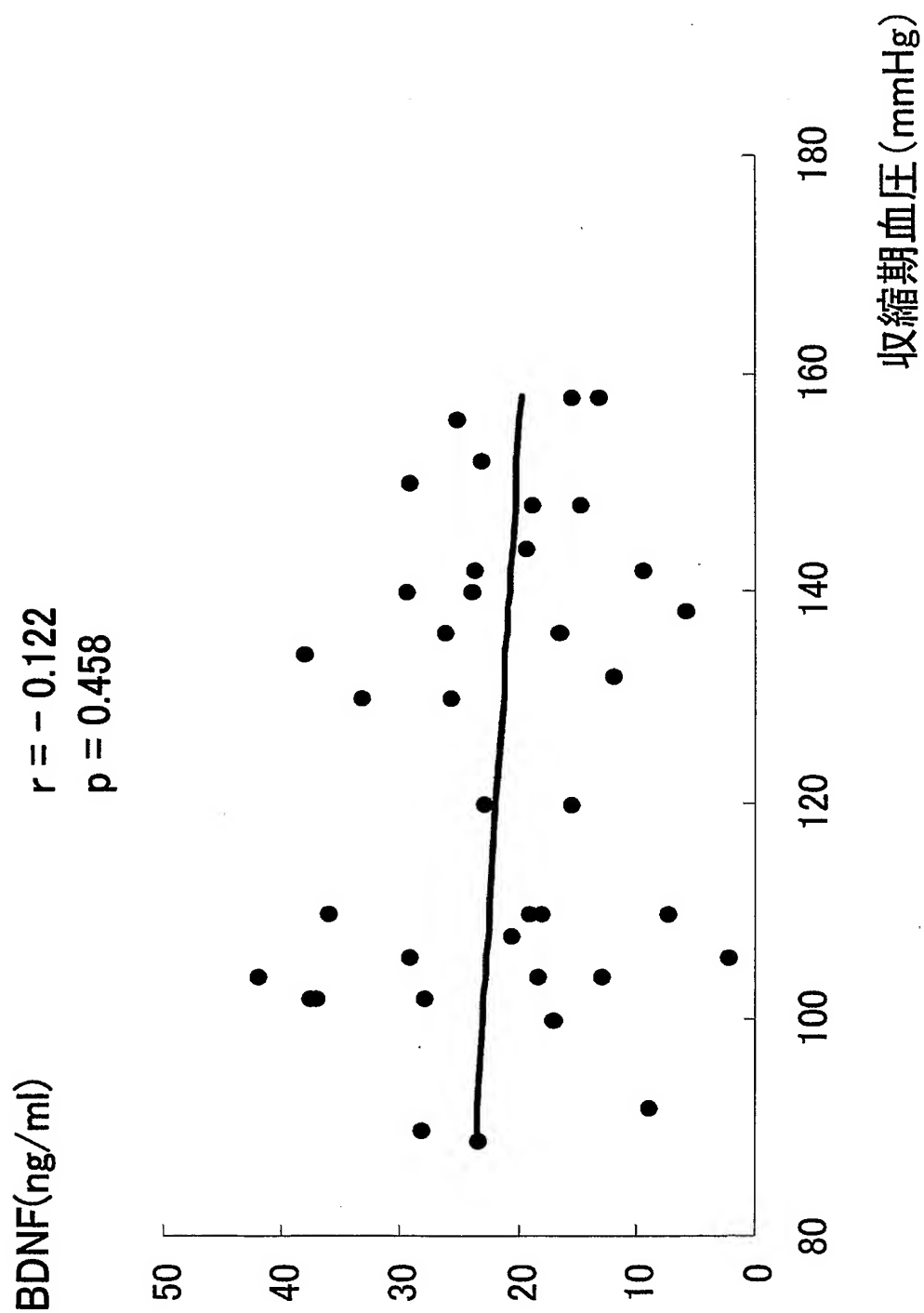
$$p = 0.246$$



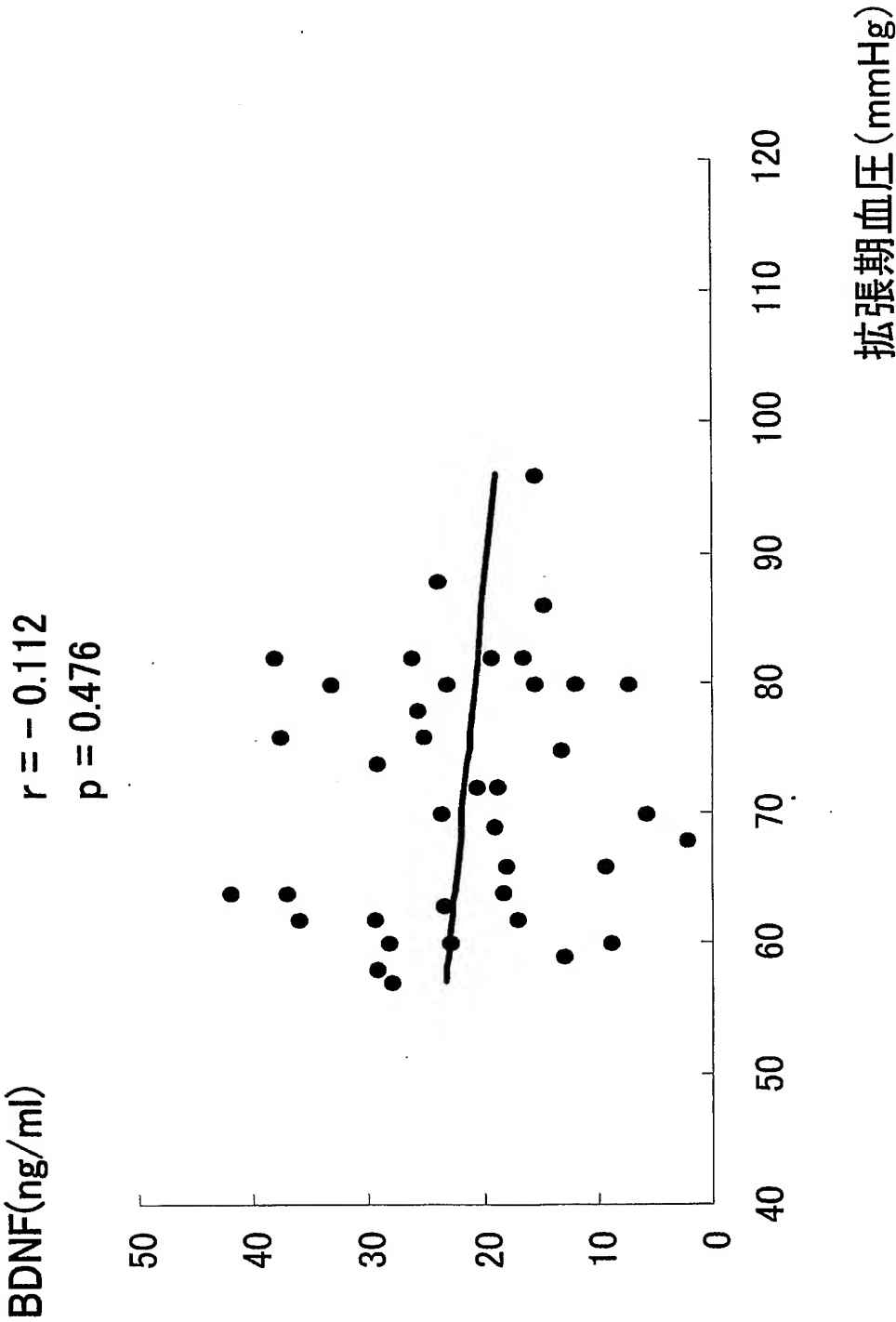
【図 8】



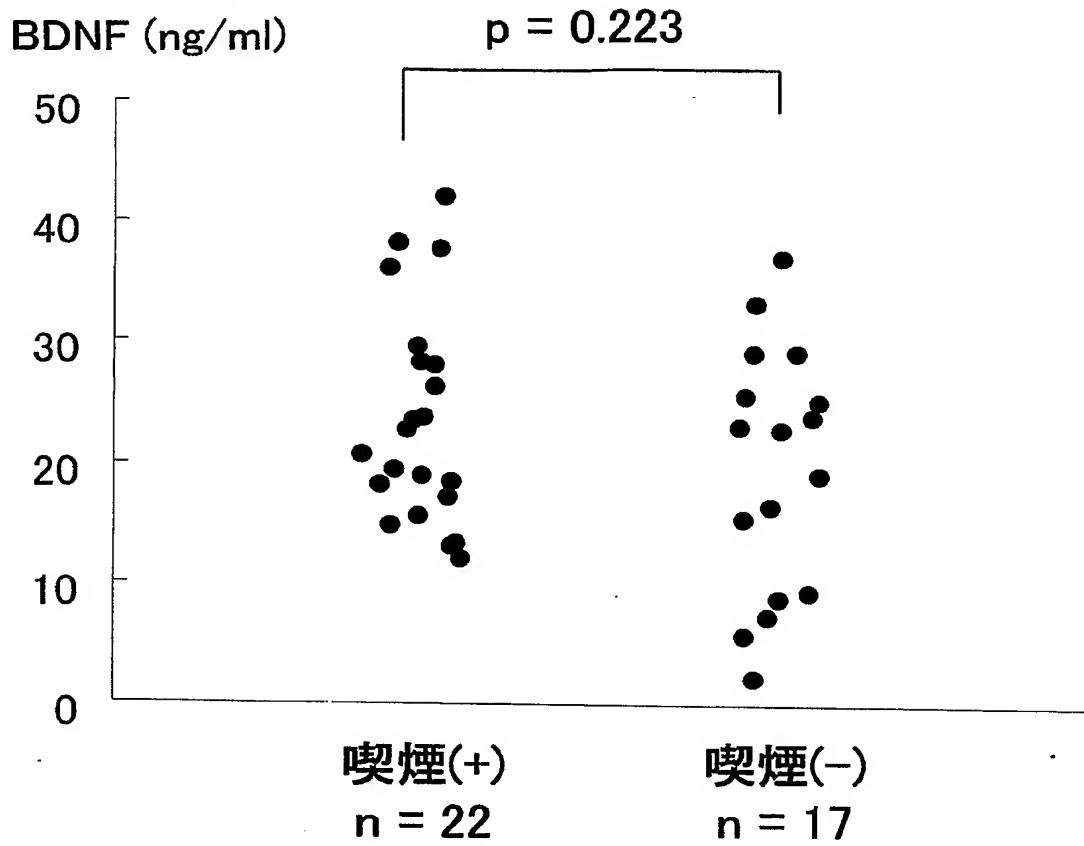
【図 9】



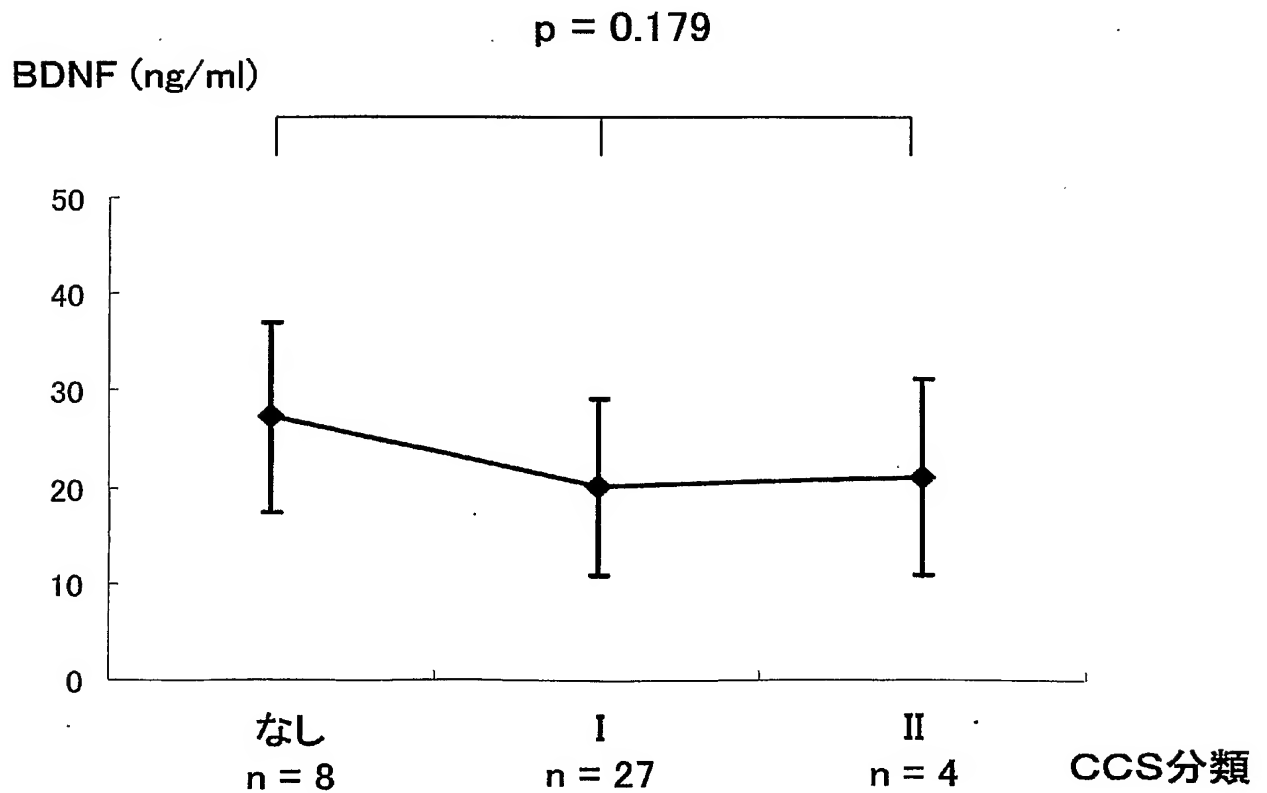
【図 10】



【図 1 1】



【図 1 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 虚血性心疾患危険群の診断法の提供。

【解決手段】 抗脳由来神経栄養因子抗体を有効成分とする虚血性心疾患危険群の診断薬および血液中の脳由来神経栄養因子の濃度を測定することによる虚血性心疾患危険群の検定方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

| | |
|---------|--------------------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2 0 0 4 - 0 5 9 0 6 5 |
| 受付番号 | 5 0 4 0 0 3 4 9 7 7 4 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第八担当上席 0 0 9 7 |
| 作成日 | 平成 1 6 年 3 月 8 日 |

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成16年 3月 3日

特願 2004-059065

出願人履歴情報

識別番号

[390037327]

1. 変更年月日

1990年12月12日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都中央区日本橋3丁目13番5号

氏名

第一化学薬品株式会社

特願 2 0 0 4 - 0 5 9 0 6 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 4 0 8 4 1 5 5]

1. 変更年月日

2 0 0 4 年 3 月 3 日

[変更理由]

新規登録

住 所

千葉県四街道市千代田五丁目 9 番 1 2 号

氏 名

大門 雅夫